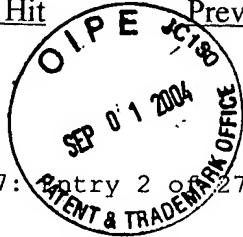


[First Hit](#)[Previous Doc](#)[Next Doc](#)[Go to Doc#](#)
 [Generate Collection](#) [Print](#)

L7: Entry 2 of 27

File: JPAB

Mar 14, 1995

PUB-N0: JP407070209A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 07070209 A

TITLE: POLYSACCHARIDE SUBSTANCE, NPS, ITS PRODUCTION AND USE THEREOF

PUBN-DATE: March 14, 1995

## INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
YAMAMOTO, YOSHIHIRO	
MUROZAKI, SHINJI	
KAYANO, SHINICHI	
KONYOU, MUTSUMI	

## ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
TAKEDA SHOKUHIN KOGYO KK	
SANKI SHOJI KK	

APPL-NO: JP06146029

APPL-DATE: June 28, 1994

INT-CL (IPC): C08 B 37/00; A61 K 31/73; A61 K 35/74; A61 K 35/74; C12 P 19/04

## ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain a physiologically active polysaccharide substance, NPS having excellent anti-inflammatory action, myeloid cell proliferation-promoting effect and B lymphocyte proliferation-suppressing effect by separating and collecting the substance from a cultured mixture of NPS-producing bacterium of the genus Lactobacillus.

CONSTITUTION: An NPS-producing bacterium belonging to the genus Lactobacillus is cultured in a medium and a polysaccharide substance, NPS, is produced and accumulated in the cultured mixture and collected. This polysaccharide substance NPS has the following physicochemical properties. Elementary analysis: C: 40.2±6, H: 6.3±0.8, N: 1.3±0.4, O: 53.1±10; molecular weight: about 2000000-1000000; melting point: decomposed to black brown at nearly 270°C; infrared ray spectrum: 3413, 2925, 1649 and 1550cm<sup>-1</sup>; solubility, soluble in water and insoluble in methanol, acetone, etc.; color reaction: Molisch reaction +; anthrone reaction +; cysteine-sulfuric acid reaction -; carbazole-sulfuric acid -; Elson-Morgan's reaction -; ninhydrin reaction -; 0.5% aqueous solution of the substance exhibits pH 7.2; the lyophilized substance is white and fibrous; glucose: galactose: N-acetylglucosamine = (2.5-3.5):(2.5-3.5):1.

COPYRIGHT: (C) 1995, JPO

[Previous Doc](#)[Next Doc](#)[Go to Doc#](#)

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-70209

(43)公開日 平成7年(1995)3月14日

(51)Int.Cl. <sup>b</sup>	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 08 B 37/00	Z	7433-4C		
A 61 K 31/73	ABE	9454-4C		
35/74	ABC G	7431-4C		
	ADU G	7431-4C		
C 12 P 19/04	C	7432-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号	特願平6-146029	(71)出願人	000238511 武田食品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目3番6号
(22)出願日	平成6年(1994)6月28日	(71)出願人	592004998 三基商事株式会社 大阪府大阪市北区梅田1丁目2番2-800号
(31)優先権主張番号	特願平5-164553	(72)発明者	山本 佳弘 兵庫県伊丹市荻野8丁目21番地の2 ハイツマインド203号
(32)優先日	平5(1993)7月2日	(72)発明者	室▲崎▼伸二 奈良県奈良市芝辻町三丁目6番27-208号
(33)優先権主張国	日本 (J P)	(74)代理人	弁理士 青山 茂 (外1名)
			最終頁に統く

(54)【発明の名称】 多糖物質N P S、その製造法および用途

(57)【要約】

【目的】 生理活性を有する新規多糖物質の提供。  
【構成】 ラクトバチルス属の乳酸菌から単離された抗炎症効果および骨髄細胞増殖促進効果を有し、明細書に記載する理化学的性質を有する新規多糖物質N P SならびにN P S生産菌を培養するその製造法、N P Sを含有する抗炎症剤、骨髄細胞増殖促進剤およびBリンパ球増殖抑制剤。

【効果】 抗炎症剤、骨髄細胞増殖促進剤、Bリンパ球増殖抑制剤等として有用な、新規多糖物質が提供できる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の理化学的性質を有する多糖物質N P S。

## (1)元素分析値

C: 40.2 ± 6

H: 6.3 ± 0.8

N: 1.3 ± 0.4

O: 52.1 ± 10

## (2)分子量

2,000,000~100,000程度

## (3)融点

270°C付近で黒褐色に分解する。

## (4)赤外吸収スペクトル(KBr法)

3413, 2925, 1649, 1550cm<sup>-1</sup>

## (5)溶剤に対する溶解性

水に可溶、メタノール、エタノール、アセトン、エーテルに不溶

## (6)呈色反応

(a)モーリッシュ反応 +

(b)アンスロン反応 +

(c)システィン-硫酸反応 -

(d)カルバゾール-硫酸反応 -

(e)エルソン-モルガン反応 -(ただし塩酸加水分解後+)

(f)ニンヒドリン反応 -(ただし塩酸加水分解後+)

## (7)塩基性、酸性、中性の別

0.5%水溶液はpH 7.2を示す。

## (8)物質の色

凍結乾燥品は白色繊維状である。

## (9)構成糖の種類及び組成比

グルコース:ガラクトース:N-アセチルグルコサミン=2.5~3.5:2.5~3.5:1

【請求項2】 ラクトバチルス(*Lactobacillus*)属に属するN P S生産菌を培地に培養し、培養物中に多糖物質N P Sを生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする多糖物質N P Sの製造法。

【請求項3】 ラクトバチルス属に属するN P S生産菌が、ナリネ発酵乳より分離したラクトバチルス・ヘルベティカス MIKI-020 (*Lactobacillus helveticus* MIKI-020)である請求項2記載の製造法。

【請求項4】 多糖物質N P Sを有効成分とする抗炎症剤。

【請求項5】 多糖物質N P Sを有効成分とする骨髄細胞増殖促進剤。

【請求項6】 多糖物質N P Sを有効成分とするBリンパ球増殖抑制剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、有用な生理活性を有す

2

る新規な多糖物質N P S、その製造法および用途に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来から、微生物の生産する多糖物質に対する研究は数多くなされており、近年、乳酸菌の生産する多糖物質の研究およびその生理活性についての報告もいくつかなされている(特開昭58-198495号、特開昭63-61002号およびAgric. Biol. Chem. 47(7)1623~1625, 1983)。

## 10 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは、食品中の微生物の研究を進める中で、ソビエト連邦コーカサス地方で古くから飲用されているナリネ発酵乳中の乳酸菌であるラクトバチルス・ヘルベティカス MIKI-020 (*Lactobacillus helveticus* MIKI-020)が新規な多糖物質N P Sを生産することを見出だし、これを単離することに成功し、かくして単離されたN P Sの生理活性を研究したところ、顕著な抗炎症効果、骨髄細胞増殖効果およびBリンパ球増殖抑制効果を示すことが判明した。

【0004】 炎症は体内に微生物等が進入すると、微生物等を処理するために起こる必要な生体反応であり健常人においても常に誘起される反応である。この炎症が継続すると生体に対してダメージを与え、老化、自己免疫疾患、癌、動脈硬化を誘発する一因になると考えられている。現在、抗炎症剤としては、非ステロイド系抗炎症剤、ステロイド系抗炎症剤、免疫調整剤などが広く用いられているが、いずれも胃腸障害、免疫機能低下などの副作用を持ち、その用途は限られている。また、加齢に伴い、骨髄細胞の増殖機能が衰え、微生物感染に対する抵抗性が落ちることがよく知られている。これに対して、骨髄細胞の増殖を促進する物質として单球コロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子等が使われているが、これらの物質は制癌剤との併用、骨髄移植における骨髄細胞の回復促進を目的にしており、日常の摂取には適していない。また、Bリンパ球の異常増殖を主因とする悪性リンパ腫、Bリンパ球の異常活性により産生される自己抗体を病因とする全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患に対しては、これらのB

30 リンパ球の増殖を抑制することが有効であるが、現在Bリンパ球の増殖を特異的に抑制する薬剤は使われていない。本発明の新規多糖物質N P Sは、その抗炎症効果、骨髄細胞増殖促進効果およびBリンパ球増殖抑制効果から、すぐれた抗炎症剤や骨髄細胞増殖促進剤、Bリンパ球増殖抑制剤となるものと考えられる。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明は、以下に示す理化学的性質を有する新規多糖物質N P Sおよび該N P S生産乳酸菌の培養物よりN P Sを分離採取することを特徴とするN P Sの製造法を提供するものである。さら

50

に、本発明はN P Sを有効成分とする抗炎症剤、骨髄細胞増殖促進剤およびBリンパ球増殖抑制剤を提供するものである。

【0006】新規多糖物質N P Sの理化学的性質

(1)元素分析値 (110°C、2時間、減圧乾燥品)

C: 40.2 ± 6

H: 6.3 ± 0.8

N: 1.3 ± 0.4

O: 52.1 ± 10

(2)分子量 (セファロースCL2Bによるゲル沪過法)

2,000,000~100,000程度

(3)融点

270°C附近で黒褐色に分解する。

(4)赤外吸収スペクトル(KBr法)

3413, 2925, 1649, 1550cm<sup>-1</sup>

(5)溶剤に対する溶解性

水に可溶、メタノール、エタノール、アセトン、エーテルに不溶

(6)呈色反応

(a)モーリッシュ反応 +

(b)アンスロン反応 +

(c)システィンー硫酸反応 -

(d)カルバゾールー硫酸反応 -

(e)エルソンーモルガン反応 -(ただし塩酸加水分解後 +)

(f)ニンヒドリン反応 -(ただし塩酸加水分解後 +)

(7)塩基性、酸性、中性の別

0.5%水溶液はpH 7.2を示す。

(8)物質の色

凍結乾燥品は白色纖維状である。

(9)構成糖の種類及び組成比

グルコース:ガラクトース:N-アセチルグルコサミン=2.5~3.5:2.5~3.5:1

【0007】該新規多糖物質N P Sは、N P S生産菌を培養することにより得られる。該N P S生産菌の代表的なものとしては、本発明者らが見出したラクトバチルス属に属する乳酸菌であるラクトバチルス・ヘルベティカス MIKI-020 (*Lactobacillus helveticus* MIKI-020)が挙げられ、これは平成5年6月7日に工業技術院生命工学工業技術研究所へ寄託されており、その受託番号は、FERM P-13678である。

【0008】ラクトバチルス・ヘルベティカス MIKI-020 (*Lactobacillus helveticus* MIKI-020)の菌学的性質を以下に示す。

菌形態 桿菌

グラム染色 +

発酵形式 ホモ型

乳酸旋光性 DL

	GC含量(%)	40.4
	カラーゼ反応	-
	15°Cでの発育	-

	【0009】糖発酵性	
	アミグダリン	- マンノース +
	アラビノース	- メレジトース -
	ゼロビオース	- メリビノース -
	エスクリン	- ラフィノース -
	フルクトース	+ ラムノース -
10	ガラクトース	+ リボース -
	グルコース	+ サリシン -
	グルコネート	- ソルビトール -
	ラクトース	+ シュークロース -
	マルトース	- トレハロース +
	マンニトール	- キシロース -

【0010】以上の菌学的諸性質よりラクトバチルス・ヘルベティカスに属する乳酸菌と同定された。ラクトバチルス属に属する多糖類生産菌は、他の微生物と同様に、例えば、紫外線、エックス線、放射線などの照射、種々の変異処理、その他の手段で変異させることができ、本発明においては、MIKI-020株に限らず、この様な変異株あるいは自然に得られる突然変異株も含め、N P Sを生産する能力を有するものは、全て本発明に利用し得る。

【0011】多糖物質N P Sは、多糖物質N P S生産菌を培地に培養した後、培養物より採取される。培養培地としては、液状でも固状でもよいが、大量に処理するときには液体培地を用いるのが適当である。培地には、当該生産菌が資化し得る炭素源、窒素源、無機物質、微量

30 栄養素が適宜配合される。炭素源としては、グルコース、ガラクトース、ラクトース、フルクトースなどが、窒素源としては、酵母エキス、乾燥酵母、大豆タンパク、各種タンパク加水分解物、その他が用いられる。さらにナトリウム、カリウム、カルシウムなどを含む塩類、鉄、マンガンなどを含む金属塩類、リン酸、クエン酸、酢酸などの塩類、その他、ビタミン類(例、B1、B2、パントテン酸カルシウム、ニコチン酸など)、核酸類(例、プリン、ピリミジンなど)が適宜用いられるが、脱脂粉乳、ミルクホエー、乳カゼインおよびその加水分解物などの乳製品を含む培地はより好ましい。

40 【0012】培養条件としては、N P Sを生産する条件であればいかなる培養条件でもよく、培地のpHは、pH 4.5~7.0特にpH 5.0から6.5が好ましく、培養温度は、20~45°Cで、1日から7日間の培養が好ましい。

【0013】培養物から目的とする多糖物質N P Sを採取するには、遠心分離、溶媒分画、ゲル沪過、イオン交換クロマトグラフィー、透析等の微生物が生産する水溶性多糖類の一般的な採取方法を単独あるいは適宜組み合50 わせて行えば良い。例えば、多糖物質N P S生産菌の培

5  
養物から遠心分離によって、上澄区分と沈澱区分を得る。得られた液体区分にエチルアルコール、アセトン等の有機溶媒を加えることにより沈澱物が得られる。また、沈澱区分は、水、熱水等で抽出を行った後、遠心分離によって上澄を得、この上澄液にエチルアルコール、アセトン等の有機溶媒を加えて沈澱を得る。このようにして上澄区分と沈澱区分から得られた沈澱を水に再溶解し、不溶物を遠心分離、沪過等の方法によって除去した後、再度エチルアルコール、アセトン等の有機溶媒を加え沈澱を得る。得られた沈澱は、トリス一塩酸緩衝液等の適当な緩衝液に溶解し、同様の緩衝液で緩衝化されたジエチルアミノエチルセルロース等のイオン交換体を充填したカラムに負荷する。統いて同様の緩衝液を流し、非吸着区分を分取し、イオン交換水中で透析を行い、透析内液を凍結乾燥することにより、精製された多糖物質NPSが得られる。

【0014】多糖物質NPSを人に用いる場合の投与量は対象の疾患、投与経路、治療する患者個々の年齢および疾病の程度によって変動し得るが、通常有効成分の投与量は、1日約4mg～40gとりわけ20mg～4g、さらに好ましくは300mg～4gである。

【0015】製剤としての投与形態として、経口投与あるいは非経口投与が考えられる。経口投与に当たっては、カプセル剤、錠剤顆粒剤、シロップ剤、散剤等の剤形とし、多糖物質NPSと共に添加剤、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、安定剤等が含まれてもよい。それらの中には、澱粉、白糖、果糖、乳糖、ブドウ糖、マンニトール、ソルビトール、沈降炭酸カルシウム、結晶セルロース、カルボキシメチセルロース、デキストリン、ステアリン酸マグネシウム、タルク等があげられる。

【0016】非経口投与に当たっては、多糖物質NPSを慣用の希釈剤中に溶解または懸濁し、液剤、エマルジョン、懸濁液、坐剤およびその他適切な剤形として用いることができる。希釈剤としては、蒸留水、生理食塩水、リンゲル液、ブドウ糖水溶液、等が含まれる。その他医薬製剤には、添加剤として、乳化剤、懸濁化剤、溶解補助剤、安定剤、保存剤、無痛化剤、等張化剤、緩衝剤、pH調整剤、着色剤、皮覆剤等が含まれてもよい。また、これらの製剤は、通常の方法で製造することができる。

【0017】また、多糖物質NPSを各種食品、例えば、乳酸菌飲料、ヨーグルト、ドレッシング、粉末、顆粒食品等の形態で提供することも可能である。その場合、単離されたNPSを添加すること、及びNPS生産菌培養液をそのまま利用することも可能である。

【0018】

【実施例】つぎに、本発明の実施例および試験例を示し、本発明をさらに詳しく説明する。

実施例1

10 %脱脂粉乳培地1kgにラクトバチルス・ヘルベティカス MIKI-020(FERM P-13678)を接種し、38℃にて3日間培養を行った。得られた培養液を遠心分離し(7,000rpm、20分)上澄画分と沈澱画分を得た。得られた沈澱画分にイオン交換水300mlを加え、室温にて1時間攪拌して抽出を行い、その後、遠心分離(7,000rpm、15分)を行った。得られた上澄画分を培養液からの上澄画分と合わせた後、エチルアルコールを最終濃度50%になるように加えた。得られた沈澱物を遠心分離(10,000rpm、15分)によって回収後、イオン交換水に溶解し不溶性物質を遠心分離(10,000rpm、15分)によって除去した。この操作を3回繰り返した後、再度、エチルアルコールを最終濃度50%になるように加え沈澱を得た。得られた沈澱を0.02Mトリス一塩酸緩衝液(pH 8.5)に溶解し、同緩衝液で緩衝化されたジエチルアミノエチルセルロースカラムに負荷し、同緩衝液を流し非吸着画分を分取した。得られた非吸着画分を、流水中で1日透析した後、イオン交換水中で2日間透析を行った。得られた透析内液を凍結乾燥し、精製NPSを200mg得た。

【0019】得られたNPSの理化学的性質はつきのとおりである。

(1)元素分析値(110℃、2時間、減圧乾燥品)

C: 38.1

H: 6.5

N: 1.2

O: 54.2

(2)分子量

セファロースCL2Bによるゲル沪過法にて測定した分子量は、2,000,000～100,000程度の分子量分布を示した。以下にカラム条件を示した。

カラム条件 カラムサイズ 2.5×100cm

温度 室温

溶出液 水

流速 20ml/hr

(3)比旋光度

【0020】

【数1】

$[\alpha]_D^{25} = 50 \sim 64 \quad (C = 0.2 \text{ 水})$

【0021】(4)融点

本物質は270℃付近で黒褐色に分解する。

(5)赤外吸収スペクトル(KBr法)

図1に示すとおりである。

(6)溶剤に対する溶解性

水に可溶、メタノール、エタノール、アセトン、エーテルに不溶。

(7)呈色反応

(a)モーリッシュ反応 +

(b)アンスロン反応 +

7

(c) システインー硫酸反応 -  
 (d) カルバゾールー硫酸反応 -  
 (e) エルソーンーモルガン反応 - (ただし塩酸加水分解後 +)  
 (f) ニンヒドリン反応 - (ただし塩酸加水分解後 +)  
 (8) 塩基性、酸性、中性の別  
 0.5%水溶液はpH 7.2を示す。

(9) 物質の色  
 凍結乾燥品は白色纖維状である。

(10) 構成糖の種類および組成比

試料5mgに2Nトリフルオロ酢酸を加えて、100°Cにて8時間加水分解後、減圧濃縮乾固してトリフルオロ酢酸を除去した後、Asahipak NH2-P50(4.6×250mm 旭化成工業社製)を用いたHPLCによって分析を行った結果、グルコース:ガラクトース:N-アセチルグルコサミン=2.5~3.5:2.5~3.5:1の割合で検出した。HPLCの条件を以下に示した。

条件:カラム温度 40°C

溶離液 テトラプロビラソニウムハイドロキサイト-酢酸(pH 1.0):アセトニトリル=20:80

流速 0.6ml/分

【0022】実施例2

10%脱脂粉乳溶液を2N塩酸でpH 4.6に調整後100°Cで30分間加熱し、生じた沈澱を沪別し、2N水酸化ナトリウムでpH 7.0に調整し、再度100°Cで30分加熱し、生じた沈澱を沪別後、2N塩酸でpH 6.2に調整してホエー溶液を得た。得られたホエー溶液10リットルを培養培地としラクトバチルス・ヘルベティカス MIK I-020(FERM P-13678)を接種し、38°Cにて3日間培養を行った。得られた培養液を遠心分離し(7,000rpm、20分)上澄画分と沈澱画分を得た。沈澱画分にイオン交換水2,000mlを加え、1時間室温にて攪拌抽出を行った後、遠心分離(7,000rpm、15分)を行うことによって得られた上澄画分を培養液からの上澄画分と合わせ、2N水酸化ナトリウムでpH 6.5に調製した。この溶液を、エバポールCEP 1(大川原製作所製)を用いて、40°C、1,500rpmにて濃縮し、濃縮液3リットルを得た。得られた濃縮液にエチルアルコールを最終濃度50%になるように加えた。得られた沈澱物を遠心分離(10,000rpm、15分)によって回収後、イオン交換水に溶解し、不溶性物質を遠心分離(10,000rpm、15分)によって除去した。この操作を3回繰り返した後、再度、エチルアルコールを最終濃度50%になるように加え、沈澱を得た。得られた沈澱を0.02Mトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)に溶解し、同緩衝液で緩衝化されたジエチルアミノエチルセルロースカラムに負荷し、同緩衝液を流し非吸着画分を分取した。得られた非吸着画分を、流水中で1日透析した後、イオン交換水中で2日間透析を行った。

8

得られた透析内液を凍結乾燥し、精製NPSを得た。

【0023】実施例3

10%脱脂粉乳溶液(1kg)で38°C3日間培養したNPS生産菌の培養液に、デキストリン等の賦形剤で固形分を22%に調製後、スプレードライ、フリーズドライなどの方法により粉末化してNPSを含有した発酵粉末を得る。得られた発酵粉末を主体とし、以下の処方により作成した顆粒状食品は、NPSを40mg%程度含有する。

10	発酵粉末	50.0g
	ラフィノース	30.0g
	ローヤルゼリー	1.7g
	エレウテロコックエキス	3.3g
	ぶどう糖	15.0g

【0024】実施例4

牛乳(500ml)および脱脂粉乳(50g)に水を加え、固形分を10%に調製して均質化後、加熱滅菌した溶液でNPS生産菌を38°C3日間培養する。得られたNPS生産菌の培養液を用い、以下の処方で作成したサークリームドレッシングはNPSを39mg%程度含有する。

20	培養液	100.00g
	生クリーム	20.00g
	砂糖	8.00g
	NPS	0.03g
	食塩	1.00g
	グルタミン酸ソーダ	0.20g
	5'リボヌクレオタイドナトリウム	0.02g
	ホワイトペッパー	0.05g

30 マスタードシーズニング 0.13g

【0025】実施例5

10%脱脂粉乳培地(40リットル)にてNPS生産菌を38°C3日間培養して得られた溶液に、NPS、水、砂糖、イソマルトオリゴ糖、2%ペクチン溶液、ヨーグルトフレーバーを以下の割合で混合した溶液をホモジナイザーにて150kg/cm<sup>2</sup>の均質化処理を行い、その後、75°C、10分間加熱攪拌殺菌を行う。得られた無脂乳固形分3%の乳製品乳酸菌飲料は、NPSを106mg%程度含有する。

40	NPS	0.1kg
	水	33.6kg
	砂糖	7.0kg
	イソマルトオリゴ糖	4.0kg
	2%ペクチン溶液	25.0kg
	ヨーグルトフレーバー	0.3kg
	NPS生産菌培養10%脱脂粉乳溶液	30.0kg

【0026】実施例6

以下に示した配合量にて、各成分をよく混合後、直接加圧することにより錠剤を製造した。錠剤1錠(800mg)

50 当たりNPSを64mg程度含有する。

	9
N P S	1 6 g
乳糖	1 7 5 g
結晶セルロース	1 . 2 g
タルク	8 g

## 【0027】試験例1

本試験例では、実施例1で得たN P Sを用いて、実験的に炎症を惹起させたマウスの炎症部位の好中球数に対するN P Sの作用を調べることにより、N P Sの抗炎症効果を検証した。好中球は炎症部位において毒性物質を放出することにより周囲の正常細胞や結合組織を無差別に傷害するため、炎症部位の好中球を減少させる物質は抗炎症作用を持つ。マウス(C 3 H/HeN、雌、7週齢、1群20匹×2群)の1群には、実施例1で得たN P S 16 mgを蒸留水1mlに溶かした溶液を、別の1群には蒸留水を各々1日1回、0.5ml/マウス当たりで3日間経口投与した。経口投与開始6日目にホエー蛋白濃縮物(以下、W P C(whey protein concentrate)と略記する)をマウス当たり10mg腹腔内投与した。W P C投与前、投与後1、2および3日に各群5匹を屠殺し、マウス1匹当たり5U/mlヘパリンおよび10%Nu Serumを含有するP B Sを6ml腹腔に注入し、腹部を激しくもんだ後、注入液を回収し、腹腔滲出細胞を得た。腹腔滲出細胞数と腹腔滲出細胞中に含まれる炎症細胞である好中球の割合をフローサイトメトリーにより測定し、好中球数の変化を求めた。

【0028】図2は、その効果を示す棒図である。図中、黒棒はN P S投与群を、白棒は非投与対照群を示す。W P Cの腹腔内投与により炎症が誘引され、W P C腹腔投与1日目に炎症細胞である好中球数が両群とも増加し、N P S群は正常の免疫応答を示したが、N P S群の好中球数はその後速やかに減少し、W P C腹腔内投与2日目の好中球数はN P S群が有意に少なく、N P Sの抗炎症効果が認められた。

## 【0029】試験例2

本試験例では、実施例1で得たN P Sを用いて、実験的に白血球数を減少させたマウスの白血球数の回復に対するN P Sの作用を調べることにより、N P Sの骨髄細胞増殖促進効果を検証した。白血球は全て骨髄細胞を起源としており、減少した後に回復する白血球数は骨髄細胞の分化増殖能に比例する。マウス(I C R、雌、7週齢、1群12匹×2群)に5-フルオロウラシル(以下5 F Uと略記する)を体重1kg当たり150mg腹腔内投与し、投与翌日より、1群には実施例1で得たN P S 16 mgを蒸留水1mlにとかした溶液を、別の1群には蒸留水を、各々1日1回0.5ml/マウス当たりで3日間経口

10

投与した。5 F U投与前、投与後4、7、11および14日目にマウスの眼窩静脈叢より血液を20マイクロリットル採取し、自動血球計数装置により白血球数を測定した。図3はその結果を示す線図である。図中、黒丸はN P S投与群を、白丸は非投与対照群を示す。5 F U投与により白血球数が減少したが、N P S群の減少は僅かであり、5 F U投与4日目の白血球数はN P S群が有意に多く、N P Sの骨髄細胞増殖促進効果が認められた。

## 【0030】試験例3

10 本試験例では、実施例1で得たN P Sを用いて、マウス脾臓リンパ球増殖反応に対するN P Sの作用を調べることにより、N P SのBリンパ球増殖抑制効果を検証した。マウス(C 5 7 B L/6、雌、10週齢)から無菌的に脾臓を摘出し、R P M I 1 6 4 0 培地で脾臓を押しつぶし、# 2 0 0 メッシュに通し脾臓細胞浮遊液を得た。脾臓細胞浮遊液の細胞数を自動血球数装置により測定した後、細胞数を $1 \times 10^7 / m l$ の濃度にR P M I 1 6 4 0 培地で調製し、2 4 穴組織培養プレートに1穴当たり200マイクロリットルを播種した。Tリンパ球増殖刺激物質のコンカナバリンAを8マイクログラム/m lの濃度でR P M I 1 6 4 0 培地に溶解した液、Bリンパ球増殖刺激物質のリボポリサッカライドを200マイクログラム/m lの濃度でR P M I 1 6 4 0 培地に溶解した液、あるいはR P M I 1 6 4 0 培地を、それぞれ1穴当たり200マイクロリットル播種した脾臓細胞浮遊液に加えて、Tリンパ球刺激群、Bリンパ球刺激群、無刺激群とした。この3群にR P M I 1 6 4 0 培地(対照)あるいはN P Sを8mg/m lの濃度でR P M I 1 6 4 0 培地に溶解した液をそれぞれ1穴当たり400マイクロリットル加え、37°Cの5%炭酸ガス培養器内で3日間培養した。培養を終わる3時間前に臭化3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2Hテトラゾリウムを5mg/m lの濃度でR P M I 1 6 4 0 培地に溶解した液を1穴当たり40マイクロリットル加え、培養終了時に20%ドデシル硫酸ナトリウム溶液を1穴当たり200マイクロリットル加え、37°Cで1日放置後、脾臓細胞の増殖反応を培養液の吸光度570nmを測定することにより求めた。表1は、その結果を示す表である。Tリンパ球増殖反応に及ぼすN P Sの影響は僅かであったが、N P SはBリンパ球増殖反応を顯著に抑制し、N P SのBリンパ球増殖抑制効果が認められた。

## 【0031】

## 【表1】

11

12

吸光度 570 nm (刺激係数\*)

T リンパ球刺激群 B リンパ球刺激群 無刺激群

対 照 1.977(7.06) 0.684(2.44) 0.280

N P S 1.411(5.04) 0.233(0.83) 0.205(0.73)

\* 刺激係数：各吸光度を無刺激群の対照の吸光度で除した値

## 【0032】

【発明の効果】本発明によれば、すぐれた抗炎症作用、骨髄細胞増殖促進効果およびBリンパ球増殖抑制効果を有する新規多糖物質N P Sが提供される。該多糖物質はN P S生産菌の培養液より容易に単離採取することができる。単離されたN P Sは、製剤の形態、あるいは、無色無臭の物質であるため、味、外観等を損なうことなく既存の食品に添加することができ、さらには、N P S生産菌培養液の形態で既存の食品等に利用できるため、炎症に起因する老化、自己免疫疾患、癌、動脈硬化等の発症予防および治療に対して好適なものである。さらに、加齢に伴う免疫機能の低下予防及び治療に用いる\*

\* ことができ、また、Bリンパ球の異常増殖、ならびに異常活性に起因する悪性リンパ腫、自己免疫疾患等の発症予防及び治療に対して好適な物であり、Bリンパ球等への研究用試薬として用いることができる。

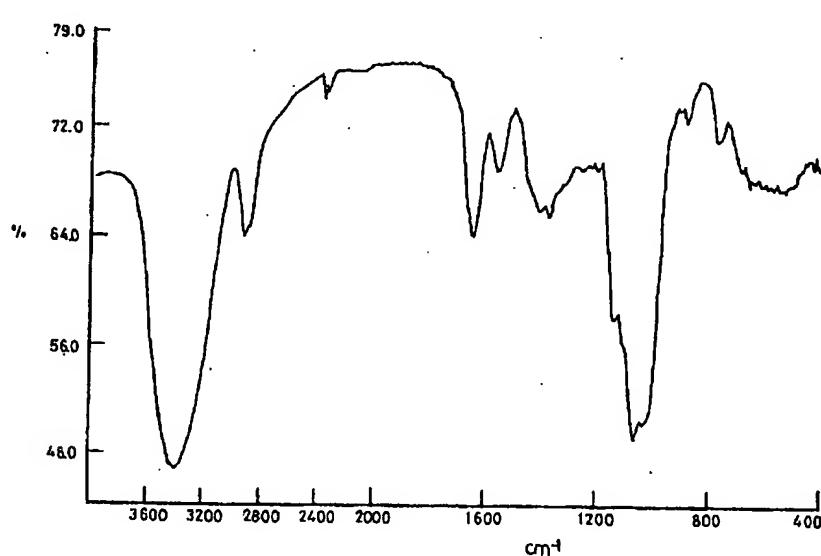
## 20 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の多糖物質N P Sの赤外吸収スペクトル図を示す図面である。

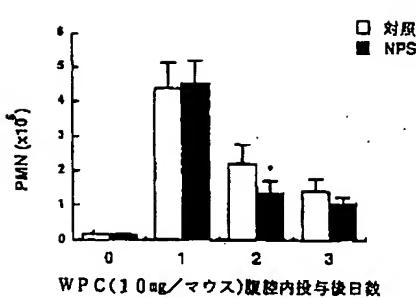
【図2】 W P Cを投与した後の腹腔好中球数を示す棒図。

【図3】 5 F Uを投与した後の白血球数を示す線図である。

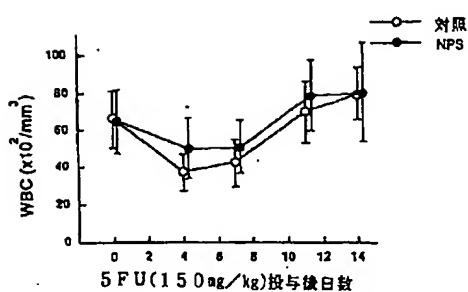
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所  
 // (C 12 P 19/04  
 C 12 R 1:225)

(72) 発明者 柏野 新市  
 兵庫県西宮市鳴尾浜3丁目12番4号 三基  
 商事株式会社総合研究所内

(72) 発明者 昆陽 瞳  
 兵庫県西宮市鳴尾浜3丁目12番4号 三基  
 商事株式会社総合研究所内